

28. Juni 2004

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP200 4 / 0 0 6 3 1 5

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 20 JUL 2004

WIPO

PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

103 26 303.9

**Anmeldetag:**

11. Juni 2003

**Anmelder/Inhaber:**

celares GmbH, 13125 Berlin/DE

**Bezeichnung:**

Reagenzien zur Modifikation von Biopharmazeutika,  
deren Herstellung und Anwendung

**IPC:**

C 07 C, A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hintermeier

A 9161  
08/00  
EDV-L

# WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte  
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

Unser Zeichen:  
30599P DE/ 1MDmh

Anmelder:

celares GmbH

Robert-Rössle-Straße 10

Haus d 79

13125 Berlin

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)  
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN  
DIPL.-CHEM. B. HUBER  
DR.-ING. H. LISKÁ  
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL  
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM  
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS  
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER  
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG  
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER  
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN  
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY  
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

---

Reagenzien zur Modifikation von Biopharmazeutika, deren Herstellung und Anwendung

---

## Reagenzien zur Modifikation von Biopharmazeutika, deren Herstellung und Anwendung

5

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, welche insbesondere zur Kopplung an Biopharmazeutika geeignet sind, sowie Konjugate aus den Verbindungen mit pharmazeutischen Wirkstoffen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auf einfache Weise durch  
10 Mehrkomponentenreaktionen gebildet werden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Konjugate als verbesserte Formulierung von Pharmazeutika.

Die Entwicklung von Biopharmazeutika als Arzneistoffe oder für potenzielle  
15 Arzneistoffe machte in den vergangenen Jahrzehnten sprunghafte Fortschritte, welche durch mehrere Faktoren entscheidend beeinflusst wurde:

- a) verbesserte Isolierungs- und Reinigungstechniken
- b) die revolutionären Entwicklungen in der Gentechnologie und damit verbunden die Möglichkeit zur Herstellung rekombinanter  
20 Proteine und
- c) das bessere Verständnis der Biochemie sowie der Wirkmechanismen von Biopharmazeutika.

Die Effektivität und die Dauer der Wirkung eines Wirkstoffs werden durch  
25 sein pharmakologisches Profil bestimmt. Besonders bei Biopharmazeutika wird sehr oft *in vivo* ein schneller Wirkungsverlust beobachtet, was allgemein als „clearance“ bezeichnet wird. Die clearance erfolgt durch Prozesse wie Stoffwechselung bzw. Metabolisierung, renale Ausscheidung und durch die Reaktion des Immunsystems auf die körperfremde Verbindung. Gerade  
30 proteinogene Wirkstoffe, eine wichtige Gruppe von Biopharmazeutika, rufen bei deren therapeutischem Einsatz eine starke Immunantwort hervor, die bis zum immunologischen oder allergischen Schock führen kann. Solche nachteiligen Effekte verhindern in vielen Fällen den kommerziellen bzw. therapeutischen Einsatz dieser sonst sehr vorteilhaften Wirkstoffklasse.

35

Wissenschaftler beschäftigen sich seit vielen Jahren damit, Strategien zu

entwickeln, den therapeutischen Einsatz von Biopharmazeutika dennoch zu ermöglichen. Eine der ersten Methoden war die Änderung der Oberflächenladung durch Umsetzung von Proteinen mit Bersteinsäureanhydrid. Diese Modifikation wird als Succinylierung bezeichnet (Habeeb, A.F.S.A. Arch. Biochem. Biophys. **1968**, *121*, 652). Eine kovalente Bindung einer biologisch aktiven Verbindung an verschiedenste Polymere stellt eine der erfolgreichsten Strategien der letzten Jahre dar und wurde zu einer der wichtigsten Methoden zur Verbesserung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften von biopharmazeutischen Wirkstoffen. Eines der am häufigsten verwendeten Polymere ist hierbei das Polyalkylenoxid Polyethylenglykol, kurz PEG genannt.

Abuchowski, einer der Pioniere auf dem Gebiet der polymervermittelten Darreichung von Biopharmazeutika, konnte zeigen, dass eine kovalente Kopplung von Polyethylenglykolketten an ein Polypeptidmolekül einen positiven pharmakologischen Effekt bei diesem Wirkstoff erzeugt. Ein solches Konjugat zeichnet sich durch eine verminderte Immunogenität und eine verlängerte Halbwertszeit im Blut aus (US-Patent Nr. 4 179 337, Davis et al.; Abuchowski & Davis „Enzymes as Drugs“, Holcenberg & Roberts, Hrsg. John Wiley & Sons, N.Y. **1981**, 367-383).

Diese Arbeiten beschleunigten massiv die Forschung auf dem Gebiet der Konjugation von Wirkstoffen mit dem Polymer Polyethylenglykol. Die Modifikation mit Polyethylenglykol bietet auch bei herkömmlichen kleinen Wirkstoffen einige Vorteile. Die kovalente Bindung eines kleinen Wirkstoffs an das hydrophile Molekül Polyethylenglykol erhöht die Löslichkeit des Konjugates und kann außerdem die Toxizität verringern (Kratz, F. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 2517-2524). Die wichtigsten Übersichtsartikel zur Konjugation mit Polyethylenglykol sind im Folgenden benannt: Greenwald, R.B., J. of Controlled Release **2001**, *74*, 159-171; Zalipsky, S. Advanced Drug Delivery Reviews, **1995**, *16*, 157-182; Zalipsky, S. Bioconjugate Chem. **1995**, *6*, 150-165; N. K. Jain, N.K.; et al. Pharmazie **2002**, *57*, 5 – 29.

35

Die chemische Reaktion zur Kopplung eines Polyethylenglykolmoleküls an ein Biopharmazeutikum erfordert die Aktivierung zumindest einer der beiden

Komponenten, die zur Reaktion gebracht werden. Im Regelfall wird hierzu das PEG-Molekül mit einem Verbindungsmolekül, dem so genannten aktivierten Linker versehen. Zur Aktivierung steht die gesamte Breite der lange etablierten Peptidchemie zur Verfügung. Zur Kopplung an  
5 Aminofunktionalitäten, meist von Lysinresten als Baustein einer biologisch aktiven Verbindung, wird der Linker häufig in Form eines N-Hydroxysuccinimid Aktivesters bereitgestellt. Harris, J.M. et al. (US-Patent Nr. 5,672,662) entwickelte diese Methode für Propion- und Buttersäurelinker, während bei Zalipsky, S. et al. (US-Patent Nr. 5,122,614) ein aktivierter  
10 Kohlensäureester zum Einsatz kommt. Die Reaktion eines Lysinrestes mit einem solchen, aktivierten Linker führt zur Bildung einer Amid- bzw. Urethanbindung. Die Verknüpfung eines PEGs mit einem Biopharmazeutikum, PEGylierung genannt, führt aber in manchen Fällen zum Verlust der biologischen Aktivität. Ein Grund dafür kann der Verlust der  
15 positiven Ladung durch die Bildung einer Amidbindung am Lysinrest sein.

Die reduktive Aminierung unter Verwendung von PEG-Aldehyden stellt eine gute Alternative zu der Verwendung von Aktivestern dar (Harris, J.M. US-Patent Nr. 5,252,714), weil diese Kopplungsmethode zur Bildung eines  
20 sekundären Amins unter Erhalt der positiven Ladung führt. Weitere Kopplungsmöglichkeiten bestehen in der Verwendung der Maleinimidmethode (Cysteinreste) und der direkten Verbindung ohne einen Linkergruppe beim Einsatz von Tresyl- oder Halogenverbindungen.

Bei den am häufigsten zur Kopplung an Biopharmazeutika verwendeten PEG's handelt es sich um lineare Monomethoxypolyethylenglykol-Ketten (m-PEG's). Diese linearen Ketten sind konformativ nicht eingeschränkt und können sich je nach Umgebung frei drehen. Folglich ist die von den Ketten abgeschirmte Oberfläche des Biopharmazeutikums relativ gering. Um die  
30 Oberflächenabschirmung zu verbessern, werden verzweigte Modifizierungsreagenzien entwickelt, die mehrere PEG-Ketten in einem Molekül enthalten. Von dieser Substanzklasse gibt es nur wenig kommerzielle Beispiele. Ein bekanntes Beispiel dafür ist ein mit zwei m-PEG-Ketten versehenes, aktiviertes Lysin. Aufgrund der auch hier vorhandenen freien  
35 Drehbarkeit der Bindungen, ist der Abschirmeffekt jedoch nur mäßig (Veronese, F.M. Bioconjugate Chem. 1995, 6, 62-69).

Obwohl die PEGylierung schon sehr weit entwickelt ist, bleiben noch einige entscheidende Nachteile bestehen:

- a) die Modifikation von Biopharmazeutika führt in vielen Fällen zu einem dramatischen Abfall der biologischen Aktivität,
- 5 b) Polymere, wie Polyethylenglykol, liegen aus Prozessgründen als komplexes Gemisch verschiedener Molekulargewichte vor, was als Polydispersität bezeichnet wird und häufig zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit bzw. Qualität führt,
- 10 c) in Abhängigkeit von der Qualität des m-PEG und der Art der Aktivierung kommt es in einigen Fällen zu unerwünschten Quervernetzungsreaktionen,
- d) die Optimierung der Reaktionsbedingungen, die Abschätzung des pharmakologischen Effekts und die Wahl des richtigen Modifizierungsreagenzes ist schwierig und zeitaufwendig.

15

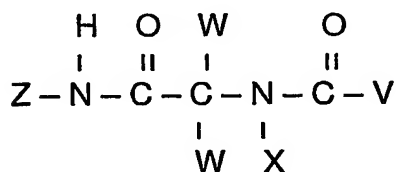
Aufgrund der beschriebenen Defizite beim Stand der Technik, gibt es einen großen Bedarf an Modifizierungsreagenzien mit neuen, variablen Eigenschaften, deren Anwendung zu entscheidenden Verbesserungen bei biotechnologischen sowie auch bei herkömmlichen, synthetischen Produkten  
20 führt.

25

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Verbindungen bereitzustellen, welche an Biopharmazeutika gebunden werden können und mit denen die Nachteile von Biopharmazeutika-Konjugaten des Standes der Technik zumindest teilweise überwunden werden können.

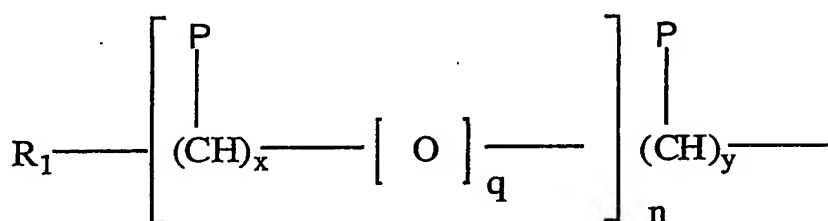
30

35



worin

die Reste V, W, X und Z jeweils unabhängig voneinander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann oder/und V, W oder/und X Wasserstoff darstellen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Bindegruppe Y trägt und dass die Reste V, W, X und Z zusammen mindestens zwei Gruppen der Formel (II)



aufweisen, worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R<sup>2</sup> oder CO-R<sup>3</sup> darstellt,

R<sup>1</sup> H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome enthalten kann,

R<sup>2</sup> bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,

R<sup>3</sup> OH oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> ist,

R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome enthalten kann, darstellen, wobei R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und

x bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und

q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen ein Grundgerüst auf, welches durch eine Mehrkomponentenreaktion, beispielsweise eine Ugi- oder eine Passerini-Reaktion erhältlich ist. Durch Verwendung einer solchen Mehrkomponentenreaktion ist es möglich, bei Auswahl geeigneter

Ausgangsverbindungen gezielt funktionelle Gruppen auf einfache Weise in einem Molekül bereitzustellen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten als funktionelle Gruppe wenigstens eine Bindegruppe Y, welche eine konvalente Bindung der erfindungsgemäßen Verbindungen an weitere Moleküle, insbesondere an biotechnologische, pharmazeutische oder synthetische Wirkstoffe, sowie an Oberflächen oder an Biokatalysatoren ermöglicht. Bei der Bindegruppe Y handelt es sich bevorzugt um eine Verbindung, welche mit einer in dem zu koppelnden Wirkstoff vorliegenden funktionellen Gruppe kovalent binden kann, beispielsweise um eine Bindegruppe, die mit einer Amingruppe, einer Thiolgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Guanidingruppe, einer Carbonylgruppe, einer Hydroxylgruppe, einem Heterocyclus, insbesondere mit N als Heteroatom (z.B. Histidinresten), einer C-nukleophilen Gruppe, einer C-elektrophilen Gruppe, einem Phosphat, einem Sulfat oder ähnlichem bindefähig ist. Möglich sind auch nicht kovalente Bindungen, z.B. Chelate, Komplexe mit Metallen, z.B. an Oberflächen oder mit Radioisotopen sowie Bindungen an Silicium-haltige Oberflächen. Geeignete Bindegruppen sind beispielsweise eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäuregruppe.

Zur späteren Kopplung der Verbindungen an ein biotechnologisches oder synthetisches Produkt enthalten die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eine aktivierte Funktionalität Y. In der aktivierten Form ist Y bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus (O-alkyl)<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (Tresyl), -CO-Q, Maleimidyl, -O-CO-Nitrophenyl oder Trichlorphenyl, -S-S-alkyl, -S-S-aryl, -SO<sub>2</sub>-alkenyl (Vinylsulfon), -Halogen (Cl, Br, I) besteht, wobei Q unabhängig aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus H, O-aryl, O-benzyl, O-N-Succinimid, O-N-Sulfosuccinimid, O-N-Phthalimid, O-N-Glutarimid, O-N-Tetrahydrophthalimid, -N-norbornene-2,3-dicarboximid, Hydroxybenzotriazole and Hydroxy-7-azabenzotriazole besteht.

Durch die Gruppe Y können die erfindungsgemäßen Verbindungen kovalent an Wirkstoffe gebunden werden und somit höchst wünschenswerte, stabile Konjugate bilden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen weiterhin mindestens zwei Gruppen der Formel (II) auf. Aufgrund der durch die Mehrkomponentenreaktion bereitgestellten Flexibilität ist es möglich, die



Gruppen der Formel (II) an beliebigen Positionen im Molekül einzufügen. So ist es möglich, in einem der Reste V, W, X oder/und Z mehrere Gruppen der Formel (II), insbesondere mindestens zwei, mehr bevorzugt mindestens drei und noch mehr bevorzugt mindestens vier Gruppen der Formel (II) einzufügen. Alternativ oder zusätzlich ist es auch möglich, Gruppen der Formel (II) in verschiedenen Resten V, W, X oder/und Z einzuführen. Auf diese Weise ist es möglich, eine Verbindung bereitzustellen, welche eine große Anzahl an Gruppierungen der Formel (II) enthält, welche einem Konjugat aus Verbindung der Formel (I) und einem Wirkstoff insbesondere eine verminderte Immunogenität, eine verlängerte Halbwertszeit im Körper, eine höhere Proteolysestabilität, eine Erhöhung der Löslichkeit sowie eine Verringerung der Toxizität verleihen. Insbesondere ist es erfindungsgemäß möglich, eine gute Abschirmung durch mehrere kurzkettinge Gruppen der Formel (II) zu erreichen, wobei kurzkettinge Gruppen der Formel (II) mit gleicher Kettenlänge mit guter Reproduzierbarkeit erhalten und eingeführt werden können. Alternativ ist es auch möglich, polydisperse Gruppierungen der Formel (II) einzusetzen.

Die Gruppen der Formel (II) stellen bevorzugt Polyalkylenoxide, wie beispielsweise Polyethylenglykol, Polyolefinalkohole, wie beispielsweise Polyvinylalkohol oder Polyacrylmorpholin dar.

In den Gruppen der Formeln (II) können die Reste bzw. Platzhalter P, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, n, x, y sowie q in einem Molekül bzw. einem Rest jeweils gleich oder auch unabhängig voneinander unterschiedlich sein. So kann der Rest der Formel (II) beispielsweise ein aus Polyethylenoxid- und Polypropylenoxidgruppen bestehendes Polyalkylenoxid sein.

Für P = CO-R<sup>3</sup> handelt es sich um Polyacrylsäuregruppierungen (R<sup>3</sup> = OH) bzw. um Polyacrylamide (R<sup>3</sup> = NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>). R<sup>4</sup>R<sup>5</sup> kann dabei Wasserstoff oder einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 30 C-Atomen, insbesondere 1 bis 10 C-Atome, mehr bevorzugt 1 bis 6 C-Atomen darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann, insbesondere ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus O, N, P und S. Die Reste R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> können zusammen auch einen Ring bilden, beispielsweise einen Morpholinring.

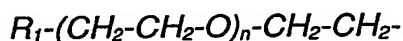
Bei dem Rest  $R^1$  handelt es sich um Wasserstoff oder einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen, mehr bevorzugt 1 bis 30 Kohlenstoffatomen und am meisten bevorzugt 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann.

5 Der Rest  $R^1$  kann gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sowie linear, verzweigt oder cyclisch sein. Besonders bevorzugt ist  $R^1$  HO,  $CH_3-O$ ,  $CH_3-(CH_2)_a-O$ ,  $(CH_3)_2CH-O$ , wobei  $a$  eine ganze Zahl zwischen 1 und 20 ist.  $R^1$  kann auch bevorzugt ausgewählt werden aus einem Acetal, z.B.  $(CH_3O)_2-$  und  $(CH_3-CH_2O)_2-$ , einem Aldehyd, z.B.  $OHC-CH_2-O-$ , einer Alkenylgruppe, z.B.  $CH_2=CH-CH_2-O-$ , einem Acrylat, z.B.  $CH_2=CH-CO_2-$  oder einem

10 Methacrylat, z.B.  $CH_2=C(CH_3)-CO_2-$ , einem Acrylamid, z.B.  $CH_2=CH-CONH-$ , einer Aminoalkylgruppe, z.B.  $H_2N-CH_2-CH_2-$ , einer geschützten Aminoalkylgruppe, z.B.  $A-NH-CH_2-CH_2-$ , wobei  $A$  eine Schutzgruppe darstellt, insbesondere N-Acyl, N-Sulfonyl, N-Silylschutzgruppen, wie z.B.

15 tert. Boc-, Alloc-, Fmoc, Tr-, Z-, Moz-, einer Thioalkylgruppe  $HS-CH_2-CH_2-$ , oder einer geschützten Thioalkylgruppe.

Bevorzugt weist die Gruppierung der Formel (II) die Formel (IIa)



auf, wobei  $n$  zwischen 0 und 1000 ist.

20  $n$  (in Formel II) ist bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000, mehr bevorzugt von 2 bis 100, noch mehr bevorzugt von 3 bis 50, insbesondere mindestens 4 und am meisten bevorzugt mindestens 5 bis 20. Erfindungsgemäß ist es möglich, Verbindungen mit einer großen Anzahl an Gruppierungen der Formel (II) bereitzustellen, insbesondere mindestens 3,

25 bevorzugt mindestens 4, mehr bevorzugt mindestens 5 und am meisten bevorzugt mindestens 9 Gruppierungen der Formel (II)

$x$  ist bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10, insbesondere 1 bis 6, mehr bevorzugt von 2 bis 3 und  $y$  ist eine ganze Zahl

30 von 0 bis 50, mehr bevorzugt von 1 bis 10, noch mehr bevorzugt von 2 bis 6.  $q$  ist bei jedem Auftreten unabhängig voneinander 0 oder 1.

Die Reste V, W, X und Z stammen aus den bei der Multikomponentenreaktion umgesetzten Edukten bzw. werden, für den Fall, dass eines der Edukte zwei oder mehr funktionelle Gruppen (Amin-, Keton- bzw. Aldehyd-, Isonitril- oder Säuregruppierung) aufweist im Verlauf der Multikomponentenreaktion aufgebaut. Bevorzugt sind Verbindungen, die bei einer Mehrkomponentenreaktion, insbesondere einer Vierkomponentenreaktion und am meisten bevorzugt bei einer Ugi-Reaktion erhalten werden, in der wenigstens ein Edukt eingesetzt wird, welches verzweigt ist, d.h. wenigstens zwei, mehr bevorzugt wenigstens drei in der Mehrkomponentenreaktion reaktive Gruppierungen (z.B. Amino-, Carbonyl-, Isonitril- oder/und Säuregruppierung) aufweisen.

Der Substituent V stammt aus der Säurekomponente, der Substituent Z aus der Isonitrilkomponente, der Substituent X aus der Aminokomponente und der Rest W aus der Carbonylkomponente.

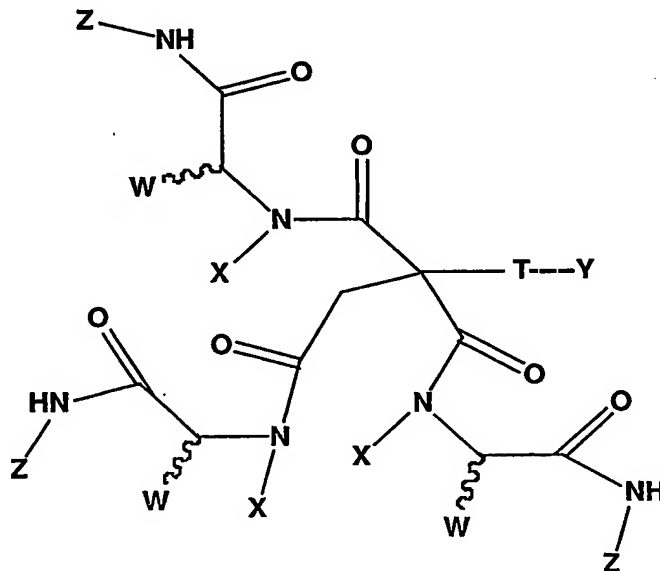
Die Reste V, W, X und Z stellen jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen Kohlenwasserstoffrest dar, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann. Ein Kohlenwasserstoffrest bedeutet hierin, soweit nicht explizit anders angegeben, einen Rest mit 1 bis 100.000 C-Atomen, mehr bevorzugt einen Rest von 1 bis 10.000 C-Atome, in einigen bevorzugten Fällen 1 bis 50 C-Atomen, welcher 0 bis 10.000, mehr bevorzugt 1 bis 1000 Heteroatome enthalten kann, beispielsweise ausgewählt aus O, P, N oder S. Die Kohlenwasserstoffreste können linear oder verzweigt sein und gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein. Ein Kohlenwasserstoffrest kann auch cyclische oder aromatische Abschnitte enthalten. Bevorzugte Kohlenwasserstoffreste sind Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Cycloalkenyl, Alkynyl, Cycloalkynyl, Aroyl sowie Heteroaroyl. Ein Kohlenwasserstoffrest, wie hierin verwendet, kann aber auch funktionelle Gruppen enthalten und beispielsweise einen Aminocarbonsäureester, beispielsweise einen gesättigten oder ungesättigten Omega-Aminocarbonsäureester, einen Farbstoff, einen Fluoreszenzmarker, ein Antibiotikum, einen Minor oder Major Groove Binder, einen Biotinylrest, einen intercalierenden Rest, einen alkylierenden Rest, ein Steroid, ein Lipid, ein Polyamin, ein Targeting-Agens, einen Receptoragonisten oder -antagonisten, einen Enzyminhibitor, ein Peptid, einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, einen Aminozucker, ein Saccharid oder Oligosaccharid, z.B. Glucose oder Mannose, ein

Antisenspolymer, eine modifizierte Oberfläche, ein grenzflächenaktives Agens oder ein komplexierendes Agens umfassen.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Targeting-Gruppierung, die das zielgerichtete Dirigieren der erfindungsgemäßen Verbindungen und insbesondere von die erfindungsgemäßen Verbindungen enthaltenden Konjugaten an einen gewünschten Zielort, beispielsweise einen Ort einer Erkrankung, wie einen Entzündungsherd oder ein Krebsgeschwür ermöglicht.

10

Bevorzugte Verbindungen werden durch folgende allgemeine Formel (III) repräsentiert:



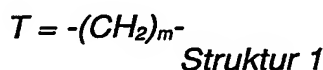
15

### Formel (III)

Verbindungen der Formel (III) können mit einem Verfahren auf der Basis einer Ugi-4-Komponentenreaktion hergestellt werden, an der eine Carbonyl-, Amino-, Isonitril- und Säurekomponente beteiligt sind. Diese Komponenten können gegebenenfalls gleichzeitig miteinander umgesetzt werden und  
20 Schutzgruppen enthalten, die später entfernt werden oder im Molekül verbleiben.

Die Säurekomponente ist hier eine 1,1,2-Ethantricarbonsäure, die zusätzlich eine Linkergruppe an der 1-Position trägt. Die zur Herstellung von Verbindungen der Formel (III) verwendete Carbonylkomponente ist  
5 bevorzugt Formaldehyd.

Der Linker T ist bevorzugt repräsentiert durch eine Alkylkette, die verzweigt oder unverzweigt, gesättigt oder ungesättigt ist, mehr bevorzugt aber eine Alkylkette der Struktur 1,  
10



wobei m eine ganze Zahl von 1 bis 10, bevorzugt aber eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist.

15 Für den Fall,

dass Y ein Acetal darstellt, weist der Linker die Struktur T'  $(OAlkyl)$  auf.  
 $(OAlkyl)$

20 Die vorliegende Erfindung trägt dazu bei, die beschriebenen, im Stand der Technik auftretenden Nachteile oder Einschränkungen zu verringern. Sie umfasst die Synthese bifunktionaler Verbindungen, welche zur Modifikation von biotechnologischen und synthetischen Produkten oder von pharmazeutischen Wirkstoffen verwendet werden können.

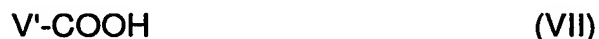
Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden als bifunktional bezeichnet, da sie zwei Funktionen enthalten, nämlich eine aktivierte Linkergruppe, die mit einer oder mehreren Aminofunktionalitäten oder anderen funktionellen Gruppen eines biotechnologischen oder synthetischen Produktes im Rahmen einer chemischen Reaktion unter milden Reaktionsbedingungen eine kovalente Bindung eingeht.

Die vorliegende Erfindung stellt bevorzugt eine mehrfach verzweigte Struktur

bereit, sowie deren Synthese und Anwendung zur Modifikation von biotechnologischen Produkten. Die Struktur kann unter Verwendung einer Mehrkomponentenreaktion, z.B. der Ugi-Reaktion (Ugi, I. et al., Angew. Chem. Int. Ed. **2000**, 39, 3168-3210), hergestellt werden. Die Verwendung der Mehrkomponentenreaktion ermöglicht einen kombinatorischen Ansatz sowie die Automation der Herstellung.

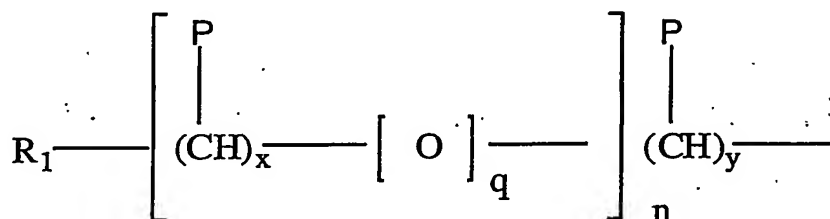
Die vorliegende Erfindung stellt bevorzugt eine bifunktionale, verzweigte Polymerverbindung bereit, die nur eine einzige aktivierte Linkergruppe trägt, wodurch Quervernetzungsreaktionen vermieden werden. Diese bifunktionale, verzweigte Polymerverbindung ist hydrophil und biologisch verträglich. Sie ist einfach herzustellen und eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten bei der Modifikation pharmazeutischer Wirkstoffe und technisch eingesetzten Produkten. Konjugate der bifunktionalen Polymerverbindung mit pharmazeutischen Wirkstoffen ermöglichen eine Verlängerung des therapeutischen Einsatzes. Weiterhin ermöglichen diese Konjugate bei Verlängerung der Wirkdauer die Verringerung der zu verabreichenden Menge an Wirkstoff, so zum Beispiel für die Behandlung von Krebs- und Infektionskrankheiten.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, wobei man in einer Mehrkomponentenreaktion als Edukte Verbindungen der Formeln



miteinander umgesetzt, wobei V', W', X' und Z' jeweils unabhängig vonei-

nander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann oder/und V', W' oder/und X' Wasserstoff darstellen, wobei wenigstens einer der Reste V', W', X' und Z' eine Bindegruppe X trägt und wobei die Reste V', W', X' und Z' zusammen mindestens zwei Gruppen der Formel (II)



aufweisen, worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R<sup>2</sup> oder CO-R<sup>3</sup> darstellt,

R<sup>1</sup> H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome enthalten kann,

R<sup>2</sup> bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,

R<sup>3</sup>, OH oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> ist

R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome enthalten kann darstellen, wobei R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und

x bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und

q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

Als Mehrkomponentenreaktion wird insbesondere eine Vierkomponentenreaktion, mehr bevorzugt eine Ugi- oder Passerini-Reaktion

und am meisten bevorzugt eine Ugi-Reaktion eingesetzt. Für den Fall, dass die Reste X', W', Z' und V' keine weitere für die Mehrkomponentenreaktion reaktive Funktionalität (also NH<sub>2</sub>, CO, NC oder COOH) mehr aufweisen, entsprechen die in den Edukten vorhandenen Reste V', W', X' und Z' gerade den in den erfindungsgemäßen Verbindungen wiederzufindenden Resten V, W, X und Z. Bevorzugt ist es aber, wenigstens ein Edukt einzusetzen, welches eine weitere Funktionalität (NH<sub>2</sub>, CO, NC oder COOH) enthält. In diesem Fall wird ein verzweigtes Molekül erhalten. Beispiele für solche Edukte sind z.B. 1,1,2-Ethantricarbonsäure mit drei Carbonsäureresten, also zwei Carbonsäuregruppierungen im Rest V' oder Reste, welche mindestens zwei verschiedene funktionelle Gruppen enthalten, wie beispielsweise Lysin (enthält gleichzeitig eine Säuregruppierung und eine Amingruppierung) oder  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Bei Verwendung solcher mehrfunktioneller Edukte werden die entsprechenden Gruppierungen V, W, X bzw. Z im Produkt ausgehend von der funktionellen Gruppe im Rest V', W', X' bzw. Z' erst bei der Mehrkomponentenreaktion aufgebaut. Auf diese Weise ist es möglich, in einer Eintopfreaktion hochverzweigte und hochfunktionelle Verbindungen aufzubauen, insbesondere Verbindungen, die eine Vielzahl an Gruppierungen der Formel (II) enthalten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Konjugate der bifunktionalen, verzweigten Polymerverbindung mit biologisch aktiven Substanzen, wie Proteinen (z.B. humane Wachstumsfaktoren), Enzymen, Liposomen, Antikörpern, synthetischen, kleinen Wirkstoffen, Phospholipiden, Lipiden, Nucleosiden, Oligonucleotiden, Mikroorganismen, humanen Zellen und Oberflächen bereitgestellt.

Die Erfindung betrifft deshalb auch Konjugate, umfassend Verbindungen der Formel (I) in kovalenter Verknüpfung an weitere Moleküle, insbesondere an Wirkstoffe, wie etwa Biopharmazeutika oder synthetische Wirkstoffe. Die in den Konjugaten an den erfindungsgemäßen Verbindungen verknüpften Verbindungen sind vorzugsweise Biopharmazeutika, peptidische Wirkstoffe oder andere biologisch aktive Substanzen. Weiterhin können auch Konjugate mit Oberflächen oder Biokatalysatoren gebildet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die erfindungsgemäßen Verbindungen und insbesondere die



erfindungsgemäßen Konjugate. Solche pharmazeutische Zusammensetzungen können beispielsweise zur Prävention oder Behandlung von Infektionen, Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder rheumatoider Arthritis eingesetzt werden.

5

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Konjugate eignen sich auch hervorragend als diagnostische Mittel.

10

Schließlich ist es aufgrund der Mehrkomponentenreaktion erfindungsgemäß ohne weiteres möglich, eine große Vielfalt von Verbindungen nach Anspruch 1 herzustellen. Durch Variation der Edukte können über weite Bereiche variierende und den jeweiligen Erfordernissen angepasste Verbindungen erhalten werden. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind somit kombinatorische Bibliotheken bzw. die Herstellung solcher

15 Bibliotheken, welche wenigstens zwei, mehr bevorzugt wenigstens fünf, noch mehr bevorzugt wenigstens 10 und am meisten bevorzugt wenigstens 100 der erfindungsgemäßen Substanzen enthalten. Mit Hilfe solcher Bibliotheken kann auf einfache Weise nach gewünschten Eigenschaften, beispielsweise Bindeeigenschaften an Wirkstoffmoleküle oder Abschirmeigenschaften für

20 bestimmte Wirkstoffe oder nach gewünschten Targetingeigenschaften gescreent werden.

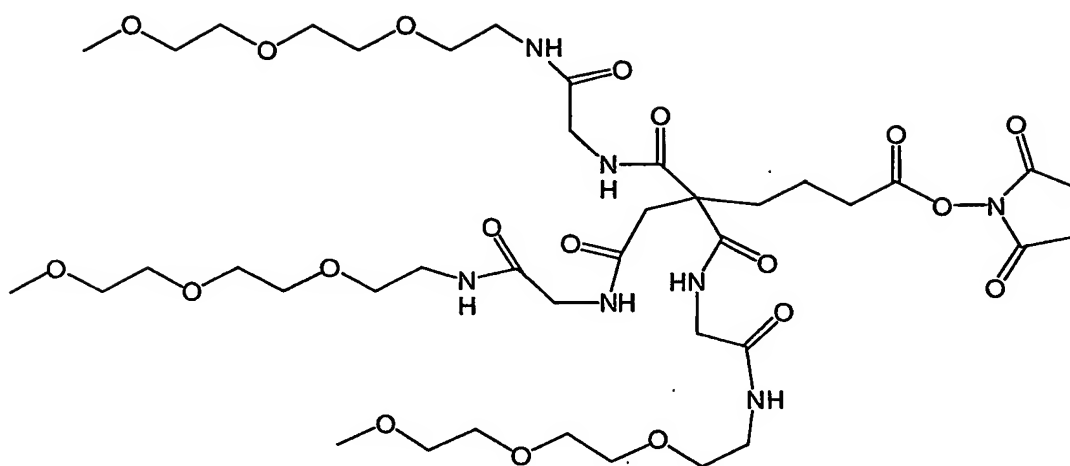
20

Die Erfindung wird durch die beigefügten Beispiele weiter erläutert:

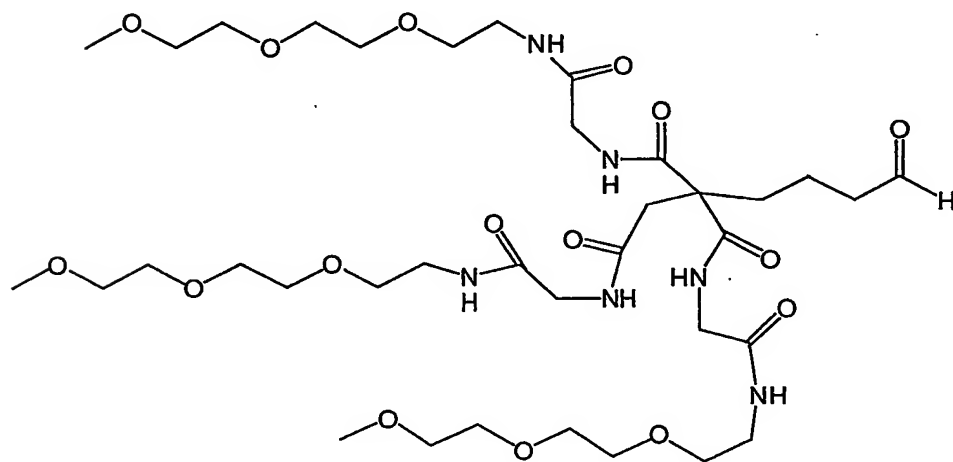
25

Beispiele

- 16 -



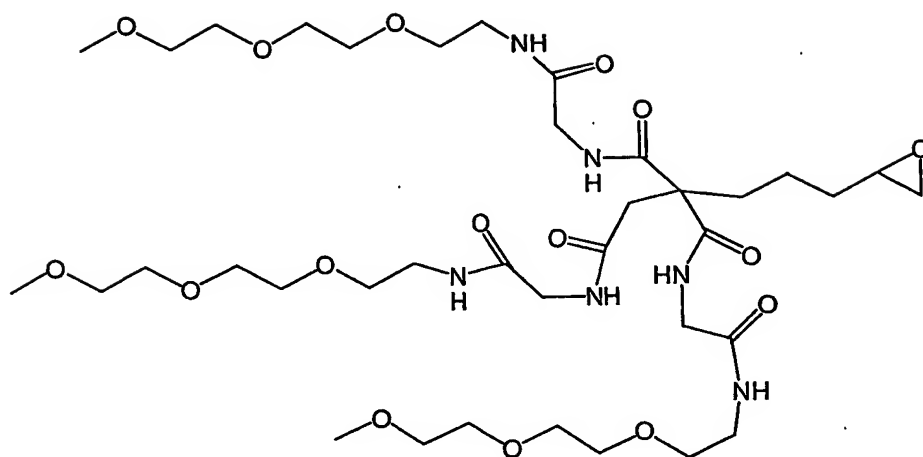
5



10

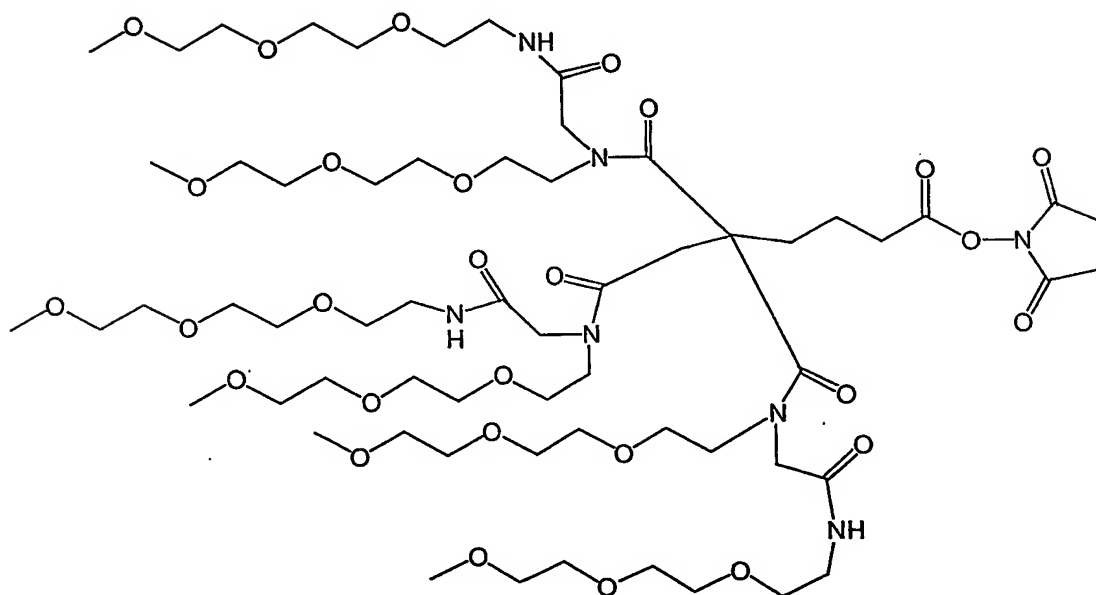
15

- 17 -

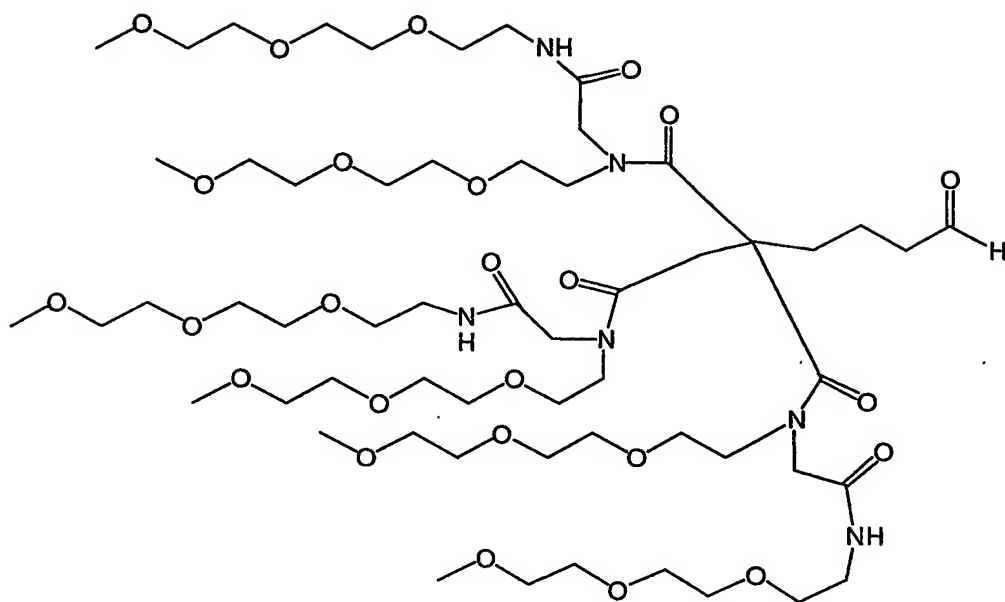


5

10

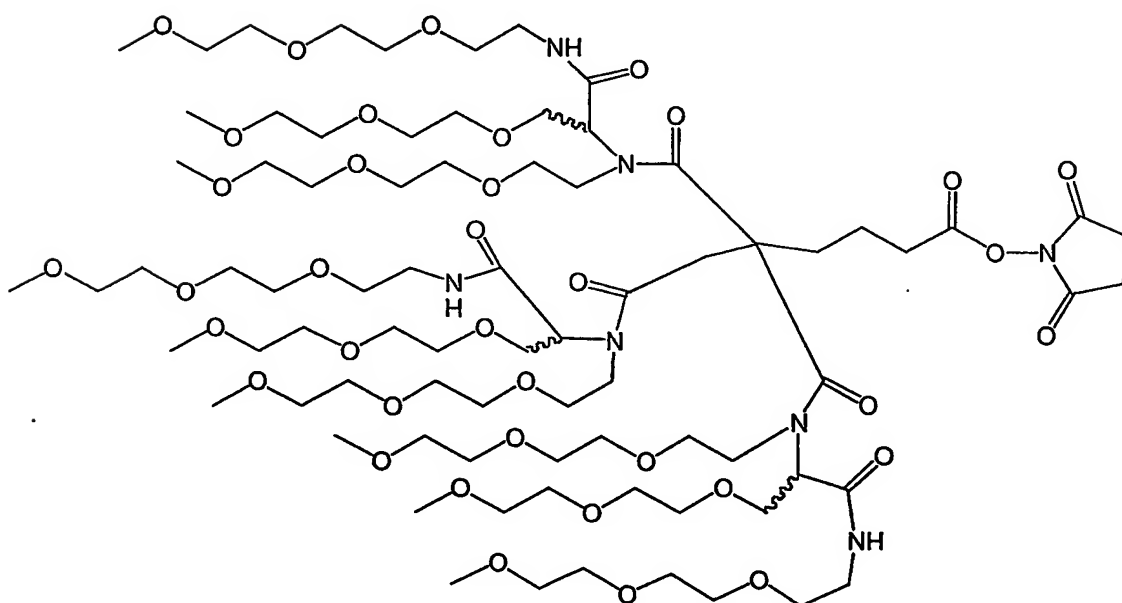


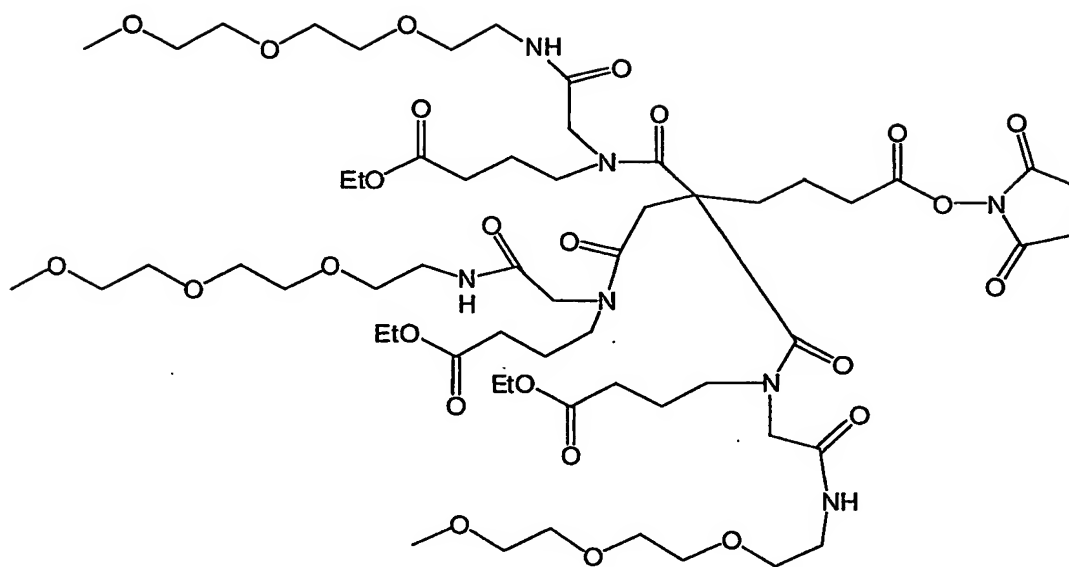
15



5

10



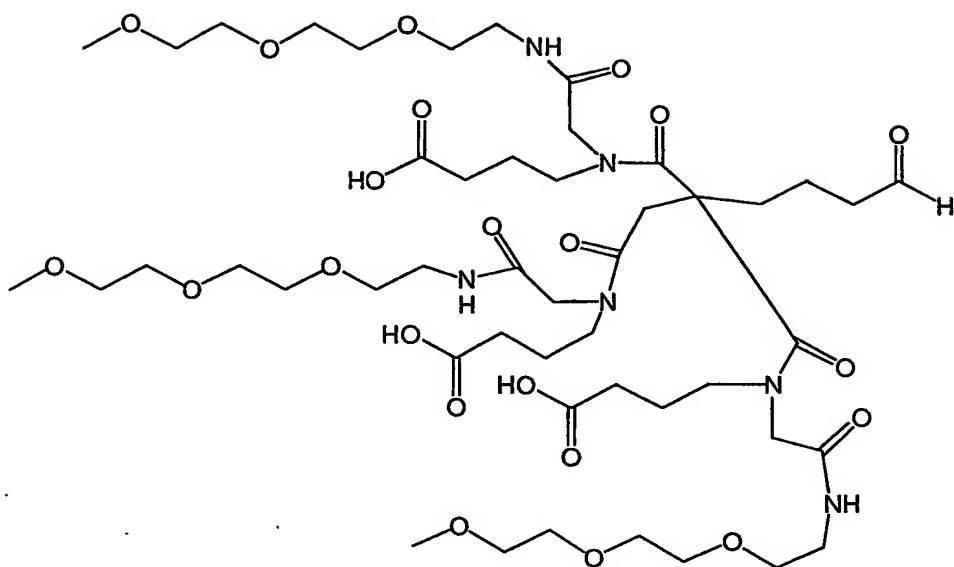


5

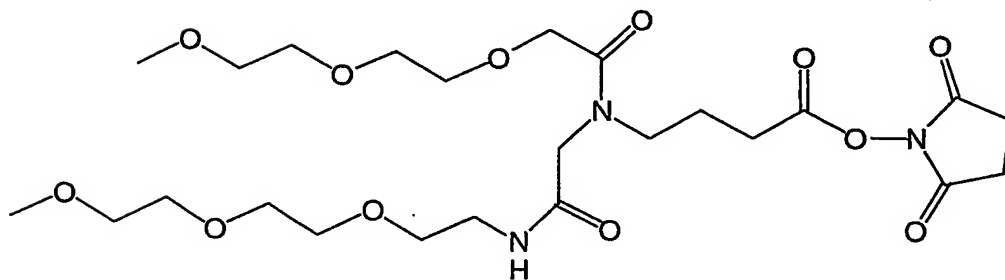
10

15

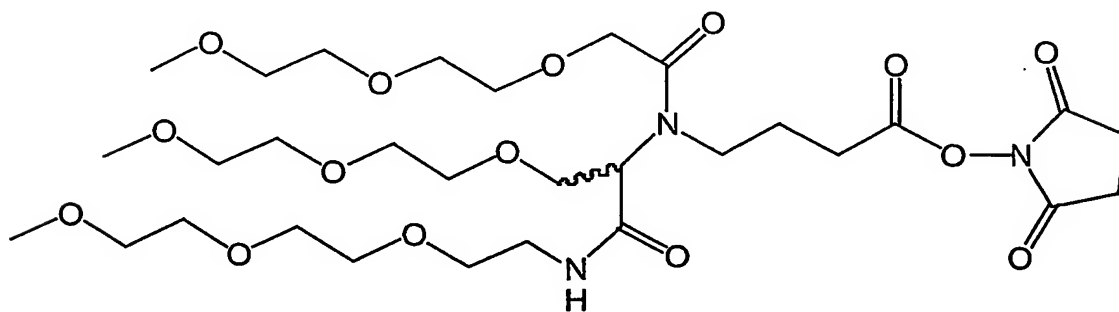
- 20 -



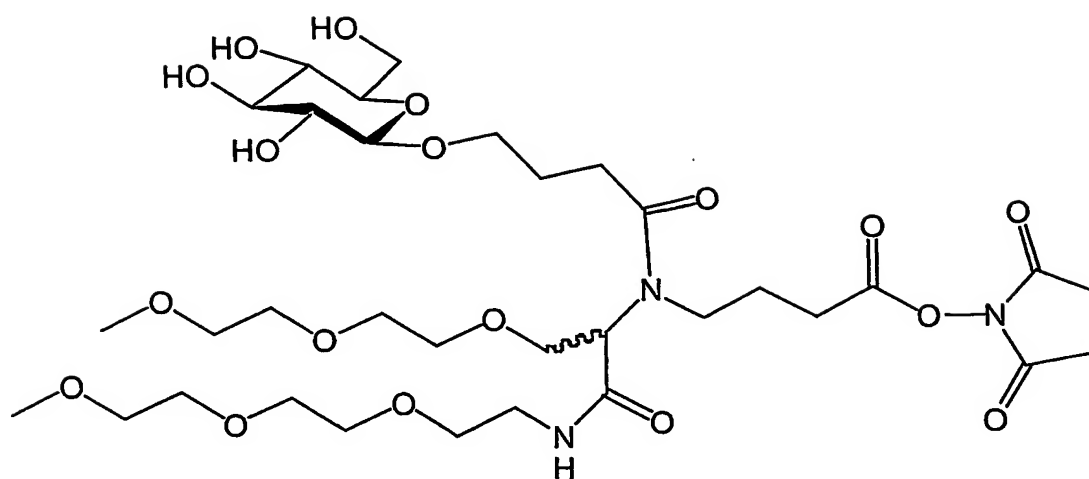
5



10



15

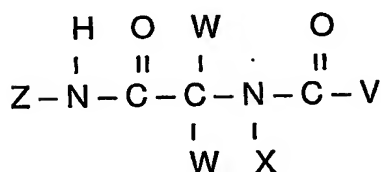


## Ansprüche

### 1. Verbindung der Formel (I)

5

10

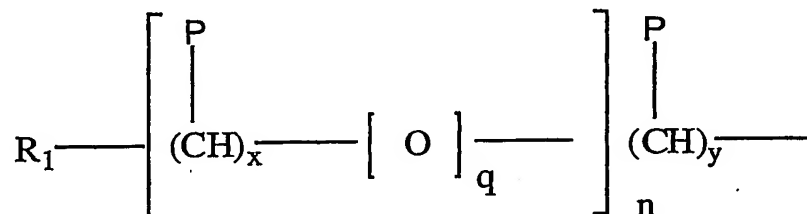


worin

15

die Reste V, W, X und Z jeweils unabhängig voneinander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann oder/und V, W oder/und X Wasserstoff darstellen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Bindegruppe Y trägt und dass die Reste V, W, X und Z zusammen mindestens zwei Gruppen der Formel (II)

20



25

aufweisen, worin

30

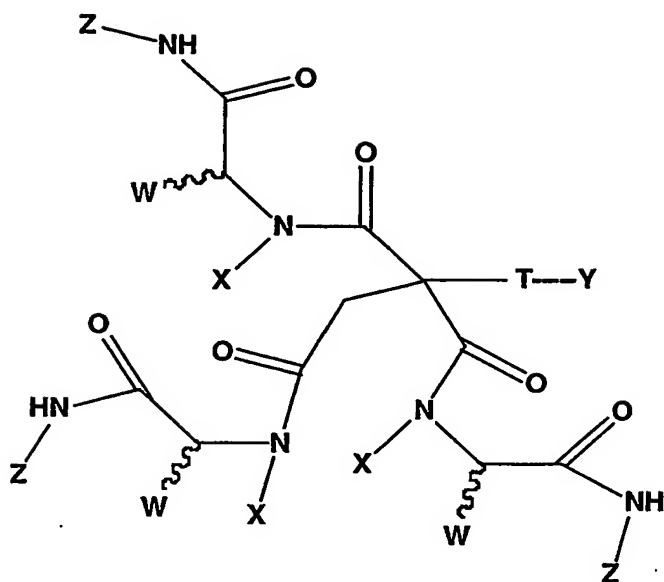
P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R<sup>2</sup> oder CO-R<sup>3</sup> darstellt,  
R<sup>1</sup> H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome enthalten kann,  
R<sup>2</sup> bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,  
R<sup>3</sup> OH oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> ist,  
R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome enthalten kann, darstellen, wobei R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> zusammen auch ein Ringsystem bilden können,  
n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und  
x bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

35



y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und  
q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Binde-  
gruppe Y ausgewählt ist aus Gruppen, die mit einer Aminogruppe, einer  
Thiolgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Guanilingruppe, einer Carbonyl-  
gruppe, einer Hydroxylgruppe, einem Heterocyclus, einer C-nukleophilen  
Gruppe, einer C-elektrophilen Gruppe, einem Phosphat oder einem Sulfat  
bindefähig sind oder ein Chelat oder einen Komplex mit Metallen bilden  
können oder eine Bindung an Silicium-haltigen Oberflächen eingehen  
können.
3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie  
wenigstens drei Gruppen der Formel (II) enthält.
4. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindes-  
tens einer der Reste V, W, X oder/und Z verzweigt ist und mindestens  
zwei Gruppen der Formel (II) enthält.
5. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch ge-  
kennzeichnet**, dass mindestens einer der Reste V, W, X oder/und Z wei-  
terhin eine Targeting-Gruppierung aufweist.
6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit der Formel  
(III)



worin W, X, Y und Z wie in Anspruch 1 definiert sind,  
T eine Verknüpfungsgruppe, bestehend aus einer Kohlenwasserstoffket-  
te, welche Heteroatome enthalten kann, darstellt und  
die Reste W, X und Z zusammen mindestens zwei Gruppen der Formel  
(II), wie in Anspruch 1 definiert, enthalten.

5

7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1  
bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass man in einer Mehrkomponentenre-  
aktion als Edukte die Verbindungen der Formeln

10

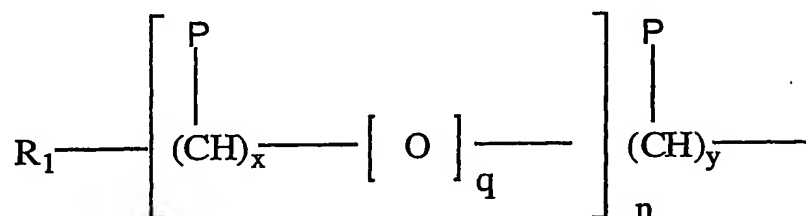


15



miteinander umgesetzt, wobei V', W', X' und Z' jeweils unabhängig vonei-  
nander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gegebenenfalls

Heteroatome enthalten kann oder/und V', W' oder/und X' Wasserstoff darstellen, wobei wenigstens einer der Reste V', W', X' und Z' eine Bindegruppe Y trägt und wobei die Reste V', W', X' und Z' zusammen mindestens zwei Gruppen der Formel (II)



aufweisen, worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R<sup>2</sup> oder CO-R<sup>3</sup> darstellt, R<sup>1</sup> H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome enthalten kann,

R<sup>2</sup> bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,

R<sup>3</sup> OH oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> ist,

R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome enthalten kann darstellen, wobei R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und

x bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und

q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass wenigstens einer der Reste V', W', X' oder/und Z' mindestens eine weitere Funktionalität, ausgewählt aus NH<sub>2</sub>, C = O, N C oder/und COOH enthält.

9. Konjugat, umfassend eine Verbindung der Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, kovalent gebunden an einen biopharmazeutischen, pharmazeutischen oder/und synthetischen Wirkstoff.

10. Konjugat, umfassend eine Verbindung der Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, kovalent gebunden an eine Oberfläche oder/und einen Biokatalysator.
- 5 11. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Konjugat nach Anspruch 9.
12. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Konjugat nach Anspruch 9 oder 10.
- 10 13. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Infektionen, Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere von rheumatoider Arthritis.
- 15 14. Verfahren zur Herstellung einer Substanzbibliothek, **dadurch gekennzeichnet**, dass man gemäß dem Verfahren nach Anspruch 7 oder 8 wenigstens zwei verschiedene Verbindungen gemäß Anspruch 1 herstellt.
- 20 15. Substanzbibliothek, umfassend mindestens zwei unterschiedliche Verbindungen der Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert.

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, welche insbesondere zur  
5 Kopplung an Biopharmazeutika geeignet sind, sowie Konjugate aus den  
Verbindungen mit pharmazeutischen Wirkstoffen. Die erfindungsgemäßen  
Verbindungen können auf einfache Weise durch  
Mehrkomponentenreaktionen gebildet werden. Ein weiterer Gegenstand der  
Erfindung ist die Verwendung der Konjugate als verbesserte Formulierung  
10 von Pharmazeutika.

ANM/30599PDE-anm/11.06.2003